

اندازه گیری فعالیت آنزیم کولین استراز در مغز ماهی سفید در انواع دریائی و پرورشی به عنوان شاخصی از میزان سلامتی این ماهی ها

**

*

چکیده:

زمینه و هدف: استفاده از سموم ارگانوفسفره به عنوان حشره کش یا علف کش از دیر باز در استان هایی مانند مازندران به علت وفور مزارع کشاورزی رواج داشته است. این سموم سرانجام در چرخه طبیعی حیات قرار گرفته و در نهایت در بدن حیوانات مانند ماهی تجمع یافته و از این طریق به بدن انسان می رسند. پساب و فاضلاب های شیمیائی نیز بطور مشابه به انسان منتقل می شوند این کار تحقیقی به منظور بررسی میزان جذب این سموم در ماهی سفید انجام شده است.

روش مطالعه: بدین منظور از روش رنگ سنجی المن در سنجش فعالیت آنزیم کولین استراز استفاده شد. نمونه های ماهی سفید، از سه منبع دریائی، پرورشی با آب چاه و پرورشی با آب رودخانه هر یک به تعداد ۸ نمونه تهیه شدند.

نتایج: با محاسبه میانگین جذب قرائت شده از مغز ماهی ها، فعالیت این آنزیم بر اساس فرمول المن به ترتیب ۳/۸۰، ۴/۳۸ و ۰/۲۲ میکرو مول استیل تیو کولین استراز هیدرولیز شده در دقیقه در هر گرم مغز ماهی محاسبه شد. بررسی های آماری توسط Student Newman Kelus test انجام شد. تفاوت معنی داری بین فعالیت این آنزیم در ماهی های سفید دریائی، چاهی و رودخانه ای بدست آمد ($P < 0/001$).

نتیجه گیری: بخصوص میزان آلودگی در ماهی های پرورشی از آب رودخانه بالاست. در این گروه تماس با سموم ارگانوفسفره، فلزات سنگین و سایر سموم بالاتر از دو گروه دیگر بود. تجمع فلزات سنگین در آب چاه، مکانیزم پیشنهادی در کاهش فعالیت این آنزیم در ماهی پرورشی با آب چاه می باشد.

واژه های کلیدی: سموم کشاورزی، روش المن، کولین استراز، ماهی سفید.

مقدمه:

که موجب اختلال در عملکرد اعضای متعددی در بدن جانداران می گردد (۲۰، ۲۲). استفاده از سموم حشره کش و علف کش کشاورزی از دیر باز در استان هایی مانند مازندران به علت وفور مزارع کشاورزی رواج داشته است. این ترکیبات در آب حل شده و سپس مزارع با این آب

ترکیبات ارگانوفسفره بطور گسترده ای به عنوان حشره کش مورد استفاده قرار می گیرند. این ترکیبات در جاندارانی که در مواجهه یا تماس با آنها هستند، خطرات و مشکلاتی را ایجاد می کنند. مهار برگشت ناپذیر آنزیم کولین استراز مکانیسم اصلی سمیت با ارگانوفسفره ها بوده

* استادیار گروه شیمی دارویی - دانشگاه علوم پزشکی مازندران: دانشکده داروسازی ساری - تلفن: ۳۲۴۱۲۷۱، ۰۱۵۱، (مؤلف مسئول)

** استادیار گروه سم شناسی - دانشگاه علوم پزشکی مازندران. *** دانشجوی داروسازی - دانشگاه علوم پزشکی مازندران.

آبیاری و یا سمپاشی می شود. بسیاری از این سموم پس از مصرف به طرق مختلف به منابع آب های سطحی راه پیدا می کنند و از این طریق به موجودات آبرزی از جمله ماهی ها می رسند. از آنجا که اکثر سموم کشاورزی مصرفی بر آنزیم کولین استراز تاثیر گذاشته و موجب کاهش فعالیت آن می شوند (۴). در طول انجام این طرح قصد بر این بوده که با اندازه گیری فعالیت این آنزیم در مغز ماهی سفید از انواع پرورشی و دریائی، کاهش فعالیت این آنزیم را با یکدیگر مقایسه کنیم. اندازه گیری کولین استراز مغزی در ماهی یک شاخص حساس و قابل قبول از آلودگی رودخانه با سموم حشره کش ارگانوفسفره و کار با ماته می باشد (۶،۷). اندازه گیری کولین استراز مغزی ۲۴ ساعت پس از تماس ماهی با سموم، کاهش فعالیت آنزیم را نشان خواهد داد. این کاهش به طور اولیه و عمده در مغز رخ می دهد (۱۹). دوره ریکاوری این آنزیم در مغز پس از یک تماس کوتاه مدت و زیر حد کشنده با حشره کش های ارگانو فسفره حدود یک ماه خواهد بود (۱۸).

سطح فعالیت این آنزیم یک شاخص مهم بیوشیمیائی و یک پارامتر حساس از برخورد با سموم و یا حضور مواد سمی در بدن بوده (۸) و به همین دلیل روش های حساس و اختصاصی متعددی برای تعیین فعالیت کولین استراز گزارش شده اند از جمله: الکترومتری، pH stat، تینتو متری، رادیومتری و رنگ سنجی (۱۵). اما استفاده روتین از آنها به علت مشکلات در تهیه نمونه، زمان اندازه گیری طولانی، اختصاصی نبودن سوبسترا به اندازه کافی و اختلال توسط محیط نمونه امکان پذیر نمی باشد. روش رنگ سنجی المن (۱۰، ۱۲) عموماً روش ارجح در ارزیابی فعالیت این آنزیم می باشد (۲۳). در این پروژه نیز از متد المن استفاده شده است. در

بسیاری از مقالات مطالعه شده به وضوح به این نکته اشاره شده است که فعالیت کولین استراز مغزی در معرض آفات نباتی و یا متابولیت های فعال آن در فاصله زمانی کوتاه (حدود ۲۴ ساعت) تغییر یافته است (۵، ۶، ۱۱). کار مشابهی در سال قبل در چهارمین کنگره سم شناسی در ترکیه ارائه شد که بیومارکر های تماس با عوامل آلوده کننده در انواع ماهی ها در دریاچه ای در ترکیه اندازه گیری و گزارش شده است (۱۶). مقالاتی نیز وجود دارد که تاثیر فلزات سنگین را بر فعالیت این آنزیم در انواع ماهی، قورباغه، مار ماهی گزارش نموده اند (۸، ۱۳). اندازه گیری فعالیت این آنزیم به شکل این ویترو (*in vitro*) در گلوبول قرمز انسان نیز قبلاً توسط نویسندگان این مقاله به عنوان شاخص تماس با فلزات سنگین به چاپ رسیده است (۳). جذب پوستی این سموم و کاهش فعالیت این آنزیم در کارگران مزارع برنج شمال کشور نیز اخیراً در آزمایشگاه ما به اثبات رسیده است (۱).

از آنجا که ردیابی تمامی سموم علف کش و حشره کش، فلزات سنگین و سایر آلاینده های محیطی به تفکیک بسیار دشوار بوده و پرهزینه می باشد، هدف از انجام این تحقیق ارائه شاخصی مناسب، سریع و کم هزینه در بررسی سلامت ماهی ها به عنوان یک منبع غذایی در زیستگاه آبی بوده است. اندازه گیری فعالیت کولین استراز مغزی نه تنها برخورد با طیف وسیعی از سموم و آلاینده های محیطی را نشان می دهد بلکه امکان مقایسه بین سلامت دو گروه را نیز امکان پذیر می نماید.

مواد و روشها:

مواد شیمیائی:

کلیه مواد مصرفی شامل دی سدیم هیدروژن فسفات دو آب، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سولفات

کینیدین، اسید دی تیو بیس نیتر و بنزوئیک، استیل تیو کولین یداید، هیامین ۱۶۲۲ از شرکت فلوکا (سوئیس) خریداری شد. برای قرائت میزان جذب از دستگاه اسپکترو فوتومتر Shimadzu UV-mini 1240 استفاده شد. هموژنیزه کردن نمونه ها نیز به کمک دستگاه Kika Eurostar (آلمان) انجام پذیرفت.

واکنشگر ها:

بافر فسفات (0.1 mol / L, pH = 7.6)، واکنشگر DTNB (Dithiobis nitrobenzoic acid) و محلول سوبسترا همانند گزارشات قبلی تهیه شد (۳،۱).

نمونه ها:

در این روش تعداد ۸ عدد ماهی سفید از خانواده کپور ماهیان (White fish, *Rutilus frisi*, Cyprinidae) از سه منبع دریا (از سواحل دریای ساری)، پرورشی با آب چاه (از روستای محمد آباد از توابع روستای دودانگه ساری) و پرورشی با آب رودخانه (از روستای قاجار خیل از توابع میانرود ساری) با محدوده وزنی ۸۰۰-۱۰۰۰ گرم تهیه و بطور زنده به آزمایشگاه سم شناسی دانشکده داروسازی منتقل شدند. به جهت افزایش سهولت کار، هر ماهی به مدت پنج دقیقه در خارج از آب قرار داده شد. سپس سر ماهی از بدن جدا گردید. سر هر ماهی به دو نیم بریده شد و مغز آن با نهایت دقت با سرنگ کشیده شد. در این عمل، نهایت دقت انجام شد تا لخته خون، پوست و اعصاب بینائی وارد محتویات سرنگ نگردد. مغز ماهی در داخل بشر کوچک از پیش وزن شده ای ریخته و سپس وزن شد. مغز حاصل ابتدا در ۲ میلی لیتر بافر فسفات هموژنیزه گردیده و سپس با مقدار مناسبی بافر فسفات رقیق شد تا مجموعه ای شامل ۲۰ میلی گرم بافت مغزی در هر میلی لیتر بافر

تهیه گردد. مخلوط مجدداً هموژنیزه و سرانجام با کاغذ صافی صاف شد. این مجموعه بلافاصله به ترتیب زیر در عملیات سنجش بکار برده شد (۹).

روش انجام مرحله سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز:

به ۲/۶ میلی لیتر بافر فسفات، ۰/۴ میلی لیتر نمونه تهیه شده در بالا اضافه شد. جذب نمونه در دستگاه صفر گردید. ۱۰۰ میکرو لیتر واکنشگر DTNB اضافه شد و جذب نمونه مجدداً در دستگاه صفر شد. ۶۰ میکرو لیتر محلول سوبسترا (محلول استیل تیو کولین یداید) اضافه شده و مجموعه بخوبی به هم زده شد. بعد از گذشت ۱۰ ثانیه، هر ۱۵ ثانیه جذب مجموعه در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد (قرائت جذب تا ۷ بار انجام پذیرفت). این عمل برای هر نمونه سه بار تکرار شده و در نهایت میانگین این اعداد در بررسی بکار رفت. بدین ترتیب جذب برای تمامی ۸ نمونه در انواع دریائی، پرورشی با آب چاه و پرورشی با آب رودخانه انجام شد. سرعت واکنش (تغییر در جذب در دقیقه) بر اساس واحد تغییر در جذب در دقیقه با نقطه گذاری جذب خوانده شده در مقابل زمان محاسبه شد. بر این اساس فعالیت آنزیم با استفاده از این فرمول (فرمول المن) قابل محاسبه خواهد بود: $R = 574 \times \Delta A/C$ (۹) جایی که R فعالیت آنزیم (سرعت هیدرولیز سوبسترا)، C غلظت اولیه بافت مغزی مورد استفاده و ΔA سرعت واکنش (تغییر در جذب در دقیقه) می باشد و از آنجا که غلظت اولیه ما در تمامی طول مطالعه ثابت نگه داشته شد (۲۰ میلی گرم بافت مغزی در هر میلی لیتر بافر)، لذا فرمول المن به صورت زیر ساده شد: $R = 28.7 \times \Delta A$ که واحد R به صورت $\mu M \text{ ASCh} / \text{hydrolyzed} / \text{min/g}$ به دست آمد (۹). بررسی های آماری توسط

Student Newman Kelus انجام شد.

نتایج:

میانگین جذب در ماهی های سفید دریائی 0.19 ± 0.0446 ، پرورشی با آب چاه 0.14 ± 0.0165 و پرورشی با آب رودخانه 0.02 ± 0.022 بدست آمد. تفاوت ها بین تمامی گروه ها از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.001$). فعالیت این آنزیم بر اساس فرمول المن به ترتیب $3/80$ ، $1/38$ و $0/22$ میکرو مول استیل تیو کولین استراز هیدرولیز شده در دقیقه در هر گرم مغز ماهی محاسبه شد. در واقع با اطمینان $99/999$ درصد می توان قضاوت نمود که فعالیت این آنزیم در مناطق دریائی و پرورشی با آب چاه و پرورشی با آب رودخانه متفاوت بوده به صورتی که ماهی دریائی سالم ترین ماهی از نظر میزان فعالیت این آنزیم می باشد.

بحث:

روش رنگ سنجی المن عموماً روش ارجح در ارزیابی فعالیت آنزیم کولین استراز می باشد. گرچه این روش سریع، ساده و ارزان می باشد با این حال از مشکلات انجام این روش در خون، تداخل جذب هموگلوبین با جذب TNB^- (آنیون ۳- کربوکسی ۴- نیترو بنزن تیولات) معرف رنگی اندازه گیری استیل کولین استراز (AChE) می باشد. برای حل این مشکل از موادی مانند هیامین استفاده می شود که جذب معرف رنگی را به طول موج بالاتر انتقال داده اما چندان موجب افزایش طول موج جذبی هموگلوبین نمی شود (۶). در بررسی فعالیت این آنزیم در مغز، چنین مشکلی وجود ندارد لذا از نظر سهولت و سرعت انجام سنجش، استفاده از مغز ماهی مناسب تر از خون می باشد. علاوه بر این، فعالیت این آنزیم در مغز در

زمان کوتاهی در تماس با سم کاهش یافته و تا یک ماه بعد نیز قابل بررسی می باشد (۵، ۶، ۱۹). در این بررسی نیز فعالیت کولین استراز در مغز مورد سنجش قرار گرفته است. این فعالیت به عنوان یک عامل در مونیتورینگ محیط پذیرفته شده است (۱۷، ۲۱). نتایج حاصل از این تحقیق اختلاف زیادی را در میزان فعالیت کولین استراز مغزی در گونه های دریائی و پرورشی نشان داد. فعالیت کولین استراز مغزی در ماهی سفید پرورشی با آب رودخانه ۱۷ بار کمتر از نوع دریائی بود. آلودگی آب رودخانه با سموم کشاورزی، پساب صنایع، فاضلاب های خانگی و فلزات سنگین عواملی هستند که همگی توانائی مهار آنزیم کولین استراز را دارا می باشند.

فعالیت کولین استراز مغزی در ماهی های سفید پرورشی با چاه تقریباً تنها $2/7$ بار کمتر از نوع دریائی بود. به نظر می رسد میزان آلودگی چاه نسبت به رودخانه بسیار کمتر باشد. با این حال تجمع فلزات سنگین از جمله کادمیوم در آن می تواند به عنوان عامل احتمالی کاهش فعالیت این آنزیم در نوع پرورشی چاهی نسبت به دریائی در نظر گرفته شود (۲). از تاثیر فلزات سنگین به عنوان یک علت برای ایجاد بیماری پارکینسون و سایر اختلالات حرکتی در انسان ذکر شده است (۱۴). در هر صورت ادامه مطالعات و بررسی میزان فلزات سنگین از قبیل سرب و کادمیوم در آب چاه و مقایسه آن با دریا این فرضیه را اثبات خواهد نمود. این تحقیق همچنین، سلامت بالاتر انواع پرورشی با آب چاه را نسبت به پرورشی رودخانه ای نشان می دهد. کاهش معنی دار آماری میان فعالیت این آنزیم در ماهی های پرورشی با آب رودخانه با نوع دریائی ($P < 0.001$) زنگ خطر جدی را برای کنترل و نظارت هر چه بیشتر در پرورش ماهی ها در استخر ها به صدا در آورده است.

پیشنهادهات:

آبزی (که واجد این آنزیم باشند) نیز شاید بتوان به الگوی مناسب و حساس تری نیز رسید.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که با حمایت های مالی خود، انجام این طرح را امکان پذیر نموده اند، سپاسگزاری می گردد.

پیشنهاد می گردد استخر های پرورش ماهی ترجیحاً از آب چاه مشروب شده یا حداقل از نظر مکانی در موقعیتی احداث شوند که پیش از مشروب شدن مزارع کشاورزی، امکان بهره وری از آب رودخانه میسر گردد. لذا پیشنهاد می گردد استخر های پرورش ماهی که از آب عبور کرده از مزارع مشروب می گردند، به نحو مقتضی اصلاح گردند. با ادامه کار بر روی سنجش فعالیت این آنزیم در سایر جانداران

منابع:

۱. ابراهیم زاده محمد علی؛ شکر زاده لموکی محمد؛ بیوک آبادی مهشاد. بررسی تاثیر سموم علف کش بر فعالیت کولین استراز اریتروسیت در کارگران مزارع برنج، مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. زیر چاپ.
۲. دیانتی رمضانعلی؛ شریعت محمود. بررسی میزان خذف کادمیوم از آب به وسیله توده باکتریائی در فیلتر سیلیسی بیولوژیکی، مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۴۰: ۲۶-۱۷، ۱۳۸۲.
3. Abdollahi M.; Biukabadi M.; Ebrahimzadeh MA. *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase activity in human red blood cells by cadmium and lead. *Acta Medica Iranica*, 36(2): 74-8, 1998.
4. Carlton F.; Simpson WM. Pesticides, the organophosphates and other insecticides. In: Haddad LM.; Winchester JF. *Clinical management of poisoning and drug overdose: From WB Saunders Company. Philadelphia: USA, 3th ed. 836-56, 1998.*
5. Cook GH.; James CM. Relationship of malathion and its metabolites of fish poisoning. *Bull Environ Contam Toxicol*, 16(13): 283-90, 1976.
6. Coppage DL.; Braidech TE. River pollution by anticholinesterase agents. *Water Res*, 10(1): 19-24, 1976.
7. Coppage DL. Organophosphate pesticide: specific level of brain AChE inhibition related to death in sheepshead minnows. *Trans Am Fish Soc*, 101(3): 534-6, 1972.
8. Devi M.; Fingerman M. Inhibition of acetylcholinesterase activity in the CNS of red swamp crayfish by Mercury, Cadmium and Lead. *Bull Environ Contam Toxicol*, 55: 746-50, 1995.
9. Dutta HM.; Munshi JSD.; Dutta GR.; Singh NK.; et al. Age related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity of heteropneustes fossilis by malation. *Comp Biochem Physiol*, 111A(2): 331-4, 1995.
10. Ellman GL.; Courtney KD.; Andres V.; Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7: 88-95, 1961.
11. Funakoshi T. Effects of dithiocarbamates and cadmium on the enzymatic activities in liver, Kidney and blood of mice. *Toxicology Letters*, 78: 183-8, 1995.

12. George PM.; Abernethy MH. Improved ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. Clin Chem, 29(2): 365-8, 1983.
13. Gill TS.; Tewari H.; Pande J. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish Barbus Conchionius Ham Comp Biochem Physiol, 100C(3): 501-5, 1991.
14. Schlenk D.; Erickson DA.; Lech JJ.; Buhler DR. The distribution, elimination and *in vivo* biotransformation of aldicarb in the rainbow trout (onchorhynchus mykiss). Fundam Appl Toxicol, 18: 131-6, 1992. Available at: <http://www.sfu.ca/msr/papers/bisc/aldicarb.html>.
15. Montgomery EB. Heavy metals and the etiology of Parkinson's disease and other movement disorders. Toxicology, 97: 3-9, 1995.
16. Omer V.; Rottinghaus G.; Biomedical determination of cholinesterase activity in biological fluids and tissues. In: Ballantyne B.; Marrs TC. Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates: From Oxford: Butterworth & Heinemann, 15-27, 1992.
17. Ozmen M.; Ayas Z.; Ekmekci G.; Yerli S. Biomarkers of exposure of different fish species to contaminants in sariyar dam lake Turkey. Congress of Toxicology, Antalya: Turkey, 4th ed. 6-10, 1999.
18. Rodriguez Fuentes G.; Goid Bouchot G. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition *in vitro*. A case study in two mexican lagoons. Marine Environmental Research, 50: 357-60, 2000.
19. Solomon SS.; Shao-Nan L.; Fan FD. *In vivo* inhibition and recovery of brain acetylcholinesterase in Teratopmouth gudgeon following exposure to fenitrothion. Journal of Zhejiang University Science, 1(4): 448-55, 2000. Available at <http://www.zju.edu.cn/jzus/2000/0004/000417.htm>.
20. Sramek J.; Cutler N. RBC cholinesterase inhibition: a useful surrogate marker for cholinesterase inhibitor activity in Alzheimer disease therapy? Alzheimer Dis Assoc Disord, 14(4): 216-27, 2000.
21. Sturm A.; Da Silva DA.; Assis HC.; Hansen PD. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. Marine Environmental Research, 47: 389-98, 1999.
22. Worek F.; Mast U.; Kiderlen D.; Diepold C.; et al. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. Clin Chim Acta, 288: 73-90, 1999 and references cited therein.
23. Wilson BW.; Sanborn JR.; O'malley MA. Monitoring the pesticide worker. Occup Med, 12: 347-63, 1997.